UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1954 — N° 375

RECHERCHES SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE DES VINS ROUGES

(Travail effectué au Laboratoire de Zoologie et Parasitologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux.)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « PHARMACIE »

Présentée et soutenue publiquement le Vendredi 5 Mars 1954

PAR

M^me^ Hélène-Germaine-Suzanne JENSEN, née DELACROIX

PHARMACIEN

Née à Bordeaux (Gironde), le 22 Juillet 1926.

Examinateurs de la Thèse :

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président*

TAYEAU, professeur ..... *Juges*

PAUTRIZEL, professeur ..... *Juges*

MASQUELIER, maître de conférences agrégé *Juges*

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, PLACE DE LA VICTOIRE

—

1954

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543913_0013

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1954 — N° 375

RECHERCHES SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE DES VINS ROUGES

(Travail effectué au Laboratoire de Zoologie et Parasitologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux.)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « PHARMACIE »

Présentée et soutenue publiquement le Vendredi 5 Mars 1954

PAR

Mme Hélène-Germaine-Suzanne JENSEN, née DELACROIX

PHARMACIEN

Née à Bordeaux (Gironde), le 22 Juillet 1926.

Examinateurs de la Thèse :

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président*

TAYEAU, professeur ..... *Juges*

PAUTRIZEL, professeur ..... *Juges*

MASQUELIER, maître de conférences agrégé *Juges*

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, Place de la Victoire

1954

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPÉRIÉ, CHELLE.
DOYEN : M. PORTMANN. — **ASSESSEUR** : M. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PÉRY, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	CREYX / BROUSTET
Clinique chirurgicale	PAPIN / MASSÉ
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	DUFOUR
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIÉCHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale.	REBOUL
Chimie	MESNARD
Matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants.	FONTAN
Zoologie et parasitologie	SIGALAS

	MM.
Pathologie générale et expérimentale	SARIC
Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.	POUYANNE
Clinique médicale et des maladies infectieuses	AUBERTIN
Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	F.-J.TRAISSAC
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DUBARRY

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL :

M. BLANQUET (Section Pharmacie)

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. MAHON (Obstétrique), PAUTRIZEL (Parasitologie)

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Physiologie	Mlle ROUGIER
Bactériologie	MOUSTARDIER
Anatomie pathologique	LÉGER
Anatomie	RIGAUD
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE

	MM.
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER / QUILICHINI
Pharmacie (3e Section)	CAZAUX
Biochimie médicale	NEUZIL
Pathologie expérimentale	FAURE

CHARGÉ DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ :

M. STOLL (Histologie)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	BERGOUIGNAN / LENG-LÉVY / MORETTI / LAVIGNOLLE
Chirurgie générale	LAUMONIER / CHAVANNAZ / VILLAR / TINGAUD / DEPAULIS
Obstétrique	CHASTRUSSE / FAUGÈRE

	MM.
Ophtalmologie	BESSIÈRE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE
Electro-radiologie	LACHAPÈLE
Odonto-stomatologie	BENOIT
Urologie	LANGE

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	LAUMONIER
Accouchements	CHASTRUSSE
Puériculture	VERGER / PÉRY
Législation pharmaceutique	COUSTOU
Anatomie	CABANIÉ
Cryptogamie	LAUBIE

	MM.
Obstétricie sociale	MAHON
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE
Chimie biologique analytique	MARQUEVIELLE
Chimie analytique	BABIN
Pathologie chirurgicale	LAUMONIER / VILLAR
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Physiologie	BENELLI

Le Secrétaire principal de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MON MARI

A MES PARENTS

A MES ENFANTS

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

RECHERCHES SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE DES VINS ROUGES

AVANT-PROPOS

Il nous est particulièrement agréable de pouvoir exprimer ici nos remerciements à ceux de nos Professeurs qui nous ont manifesté leur intérêt à l'occasion de notre thèse ou pendant nos études.

M. le Professeur agrégé Masquelier, qui a bien voulu nous donner le sujet de cette thèse, a toujours été pour nous un Maître dévoué et patient. Il n'a cessé de nous guider par son expérience et ses conseils, et nous a prodigué son temps sans compter. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre sincère reconnaissance pour la bienveillance avec laquelle il nous a accueillie dans son laboratoire et pour l'amitié qu'il nous témoigne depuis de longues années.

M. le Professeur Pautrizel nous a fait bénéficier à maintes reprises de son aimable compréhension. Qu'il veuille bien accepter l'expression de notre reconnaissance.

Nous voulons remercier Monsieur le Professeur Tayeau pour son enseignement si riche et si attrayant qui a suscité en nous le désir du travail personnel. Nous l'assurons de notre profonde gratitude pour l'intérêt bienveillant qu'il nous manifeste chaque jour.

Nous prions Monsieur le Professeur Vitte de trouver ici le témoignage de nos sentiments respectueux et de notre reconnaissance pour l'enseignement que nous lui devons.

M. le Professeur Sigalas a bien voulu s'intéresser à nous. Il nous a permis d'effectuer dans son laboratoire notre travail dans les conditions les meilleures.

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous fait en présidant notre jury de thèse, et l'assurons de notre respectueuse reconnaissance.

INTRODUCTION

Il y a fort longtemps que la sagesse populaire a fait du vin un médicament, et déjà, au premier siècle, le bon Samaritain, lorsqu'il l'employait pour panser des blessures, n'ignorait pas ses vertus.

Plus tard, l'observateur remarquable qu'est MONTAIGNE avait noté que, sur les conseils de son médecin de famille, il ne lui était permis de boire de l'eau « qu'à condition qu'elle fut mélangée plusieurs heures auparavant avec du vin ». C'est ainsi qu'empiriquement le vin était déjà utilisé pour ses propriétés bactéricides.

Aloïs PICK [36], le premier, par deux notes consécutives publiées en 1892 et 1893, signale le fait en relatant que ce pouvoir est commun aux vins blancs et aux vins rouges, et proportionnel au temps de contact avec les bactéries.

En 1907, SABRAZÈS et MERCANDIER [43] le vérifient d'une façon plus systématique. Ils ensemencent du vin rouge jeune et, surtout, des vins blancs jeunes ou vieux. Ils constatent, en particulier, que le temps de survie des bactéries est inversement proportionnel à la quantité de bactéries introduites, et font également de nombreuses remarques sur la concentration en vin nécessaire. Mais c'est surtout aux vins blancs qu'ils attribuent le pouvoir bactéricide le plus élevé. Ils pensent, en effet, que l'acidité d'un vin joue un rôle prépondérant dans l'action antityphogène, se rapportant aux travaux de KITASATO [23] relatifs à l'action des différents acides sur les bacilles de ce groupe et à l'opinion émise par

Aloïs Pick sur le rôle éventuel de chacun des acides du vin. L'hyperacidité des vins blancs expliquerait, selon eux, sa plus grande action, mais ils notent également que c'est très probablement grâce à sa teneur élevée en acide sulfureux que le vin blanc se montre plus actif. Ils ne démontrent, en réalité, aucunement à quel constituant spécifique répond cette action si rapide.

En 1936, Dietze [7] signale encore que l'alcool ne peut, à lui seul, être tenu pour responsable du phénomène, car les éléments spécifiques du vin, en particulier les acides, en augmentent l'effet. Il établit, lui aussi, un rapport étroit entre l'effet bactéricide et la teneur des vins en acides organiques, en montrant un parallélisme entre l'action de l'acide lactique sur les entérocoques et l'action des acides du vin sur le bacille d'Eberth.

En 1945, Sherb [45], dans un but d'hygiène alimentaire, étudie de façon systématique l'action d'un vin rouge ordinaire sur *Eberthella typhosa* en fonction du temps. Il constate d'abord qu'une solution alcoolique de même titre, ensemencée dans les mêmes conditions, ne présente pas d'action bactéricide et, ensuite, que le vin, débarrassé de son alcool dans la mesure du possible, conserve cette propriété intéressante.

D'autre part, ses études comparatives confirment la plus grande fragilité de *Salmonella paratyphi* A et la résistance relative du colibacille. Il conclut donc que « le pouvoir bactéricide du vin n'est pas dû à l'alcool, mais surtout à des composants : tannins, acides, etc. L'alcool ne fait que renforcer ce pouvoir ».

En 1946, à la suite d'inondations en Lorraine, Gimel [18] publie un travail fort intéressant sur la pollution des vins mouillés et constate lui aussi la destruction des bacilles du groupe typhique, en l'absence d'acide sulfureux, seul antiseptique autorisé par la loi; il établit une relation certaine entre le *p*H d'un vin et cette action.

En 1950, Gachot [15], à la suite des travaux de Sherb,

essaie d'identifier parmi les constituants autres que l'alcool, celui qui est responsable, en un temps relativement si court, de la destruction des bacilles du groupe typhique.

S'appuyant sur des travaux mettant en évidence l'action antibactérienne du jus de pomme, il rapporte l'activité du vin à la présence des acides organiques, et en particulier de l'acide malique dont une solution à 0,1 p. 100 tue les bactéries de la même façon. Remarquons toutefois, à ce sujet, qu'il semble peu probable que cet acide puisse jouer un tel rôle, car la fermentation malolactique le fait disparaître presque entièrement dans les vins vieux, sans baisse parallèle du pouvoir bactéricide.

En 1951, Lancepleine [25] donne à la recherche de l'explication de ce phénomène une orientation différente. Par une étude systématique très poussée de chaque constituant du vin blanc, il élimine de façon définitive la possibilité de rapporter aux composants si souvent nommés du vin (acides en particulier) son pouvoir antiseptique. C'est lui qui, le premier, a l'idée d'en rapporter l'action aux matières colorantes du vin, jusque là jamais soupçonnées d'un tel pouvoir.

Il montre, en effet, que les flavones et les anthocyanes, présents à la fois dans les vins blancs et les vins rouges, exercent un rôle primordial au cours de la destruction des bactéries. Pour établir la part qui revient à chaque type de polyphénol dans ce phénomène, il prépare des vins artificiellement enrichis ou appauvris en tel ou tel pigment, et en étudie l'activité. De même, il compare entre eux plusieurs vins renfermant des quantités croissantes de flavones et d'anthocyanosides.

Il conclut que les flavones n'atteignent pas une concentration suffisante pour exercer leur pouvoir inhibiteur; seuls les pigments anthocyaniques semblent responsables de l'action bactéricide envers l'Eberth; de plus, le *p*H n'intervient pas, sauf dans des vins anormalement acides.

Il était naturel d'essayer de compléter ce travail fait

uniquement sur le vin blanc, par une étude parallèle sur le vin rouge. En effet, ces deux produits présentent des compositions chimiques fort dissemblables : Lancepleine note lui-même que les vins blancs ne contiennent que fort peu d'anthocyanes représentés presque uniquement par des leucobases ou des leuco-anthocyanidols, alors que les vins rouges, on le sait, constituent le véhicule naturel par excellence des pigments anthocyaniques.

Par une recherche systématique, nous avons voulu essayer de déterminer dans quelle mesure cette action bactéricide, depuis si longtemps reconnue aux vins rouges, etait bien due aux anthocyanes, quels étaient les différents facteurs venant la modifier et dans quelles conditions elle atteignait une valeur maximum.

En effet, le problème n'est pas négligeable du point de vue de l'hygiène alimentaire. Il est intéressant de déterminer quelle peut être la survie des bactéries pathogènes ayant souillé du vin et, surtout, dans quelle mesure une eau polluée est susceptible de pouvoir être consommée après avoir éte mélangée à du vin.

Il vallait aussi la peine de chercher si le pouvoir bactéricide des anthocyanes du vin et, par-là même des raisins, ne pouvait être considéré comme un cas particulier de l'action des polyphénols en général. En effet, de nombreux travaux scientifiques publiés récemment montrent que l'attention des chercheurs se porte en particulier sur ce groupe de composés.

Schaufstatter [44] reconnaît, en effet, l'action bactéricide de toute la série des composés flavoniques, tandis que Andersen et Berry [2] déterminent l'action du flavonol sur *Clostridium botulinum*. Naghski, Copley et Couch [31] constatent l'effet synergique du quercétol sur l'inhibition par le dicoumarol d'une culture de staphylocoque, et l'action antagoniste de la rutine et du quercitrin.

Lancepleine signale cette activité du quercétol sur *Corynebacterium diphteriae* et *Diplococcus pneumoniae*, et la

perturbation du métabolisme du pneumocoque type I par la flavannone isolée de l'Arachide par Tayeau et Masquelier [29].

D'autre part, un certain nombre de travaux sont actuellement menés de façon systématique sur des plantes d'Amérique ou de l'Inde, dans le but d'y rechercher ou d'isoler des substances bactéricides analogues. C'est ainsi que Mac Donald et Bishop [27] extraient des feuilles de pommier une substance — la phlorétine — active sur un certain nombre de germes Gram positifs ou négatifs, substance qui se retrouve dans un grand nombre de Rosacées. Dans une seconde publication, ils recherchent systématiquement ce pouvoir dans de très nombreuses plantes, ainsi que Hughes [21] en Californie. Agostinucci [1], en Italie, le remarque sur des extraits de fleurs.

En 1949, Floch [12] met en évidence les propriétés microbicides du tannin capable d'inhiber la culture des staphylocoques, et d'un grand nombre de germes, dont ceux du groupe typhique.

Dans un article récent, Vincent [48] analyse les différentes recherches effectuées sur les végétaux supérieurs et montre que ceux-ci manifestent des propriétés antibactériennes considérables sans toutefois atteindre l'activité des antibiotiques fungiques. Il met en lumière les travaux de Dickinson [6] et Chantrill [5] qui rapportent les résultats d'expériences menées sur un très grand nombre d'espèces végétales afin d'en tester l'activité inhibitrice respective vis-à-vis du virus de l'influenza.

Il remarque, en particulier, que ces plantes sont fort irrégulièrement réparties dans la classification botanique, mais que leurs principes actifs, s'ils ne sont pas complètement encore élucidés du point de vue chimique, font tous partie du groupe des tannins ou des tannoïdes, ou tout au moins sont extraits avec les produits de ce groupe chimique.

De nombreuses plantes à tannin sont actuellement étudiées de ce point de vue. Green [20] et Carson et Frisch

[4] ont montré très récemment que le composé responsable de cette action était l'acide tannique.

Ainsi, l'étude des végétaux nous conduit à reconnaître que la croyance populaire aux vertus des plantes ou de certains produits naturels, tels que le vin, n'est pas toujours injustifiée.

CHAPITRE PREMIER

GÉNÉRALITÉS SUR LES POLYPHÉNOLS DU VIN

Il nous a semblé utile de faire précéder l'étude du pouvoir bactéricide proprement dit, de quelques précisions concernant l'état actuel de nos connaissances sur les colorants naturels des vins. Nous consacrons donc ce chapitre à un bref rappel de notions générales sur les familles chimiques auxquelles appartiennent les substances polyphénoliques des vins et, en particulier, les pigments colorés.

I. — CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES PIGMENTS PHÉNOLIQUES NATURELS : FLAVONES ET ANTHOCYANES

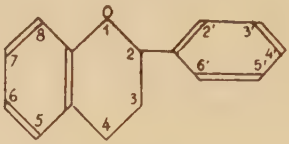
Dans les raisins et, par suite, dans les vins, nous retrouvons la présence, habituelle chez de très nombreux végétaux, de pigments colorés qui, malgré la diversité de leur coloration et de leur répartition botanique en général, sont, pour la plupart, des glucosides que l'on peut scinder, par hydrolyse, en glucide et en aglucone : ce sont les flavones et les anthocyanes.

Le glucide est généralement du glucose ou du rhamnose et, quelquefois, du galactose.

L'aglucone appartient au groupe du benzopyrane et, plus précisément, à la famille chimique qui a pour squelette fondamental le chromanne.

Chromanne

L'atome d'hydrogène, en 2 ou 3, y est remplacé par un groupement phényle : on obtient alors le flavanne.



Flavanne

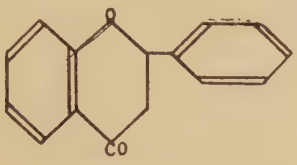
De ce squelette dérive toute une série de substances parmi lesquelles les flavones et les anthocyanes qui nous intéressent ici.

A. — Les flavones

L'oxydation du CH_2 en 4 du squelette fondamental du chromanne donne la chromanone qui, par déshydrogénation, donne le gamma benzopyrane ou chromone.

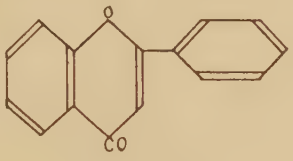
Chromone

La chromanone, par substitution en 2 d'un radical phényle, donne la flavannone.



Flavannone

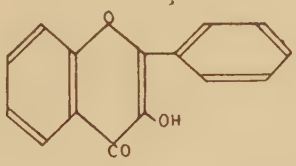
Le chromone, par substitution en 2 d'un radical phényle, donne la flavone.



Flavone

Les dérivés naturels possèdent un ou plusieurs oxhydryles, soit sur le noyau C, soit sur le noyau B, ces oxhydryles pouvant être libres, sous forme d'éther méthylique ou glucosidique.

Si le noyau pyrole est oxhydrylé en 3, on obtient un flavonol.



Flavonol

La flavannone et la flavone sont des substances cristallisées incolores. Parmi les dérivés hydroxylés et parmi les flavonols, on trouve des colorants jaunes qui étaient utilisés autrefois pour leurs propriétés tinctoriales. Ces corps sont stables en milieu acide dilué.

L'action des agents réducteurs sur les flavones et les

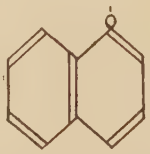
flavonols en milieu acide est connue depuis fort longtemps; elle donne naissance à des colorations allant du rouge au violet, par formation d'anthocyanidols. C'est ainsi que Willstatter et Mallison [51] obtiennent et identifient à partir du quercétol l'anthocyane correspondant, ou cyanidol. Ce dernier, soumis à une réduction énergique par Freudenberg [13], permet à cet auteur d'aller jusqu'au stade ultime des catéchols.

Ces phénomènes sont à retenir, car la présence simultanée de ces différents corps dans les tissus végétaux peut suggérer l'existence d'un métabolisme commun où ces diverses transformations s'opéreraient sous le contrôle d'enzymes spécifiques.

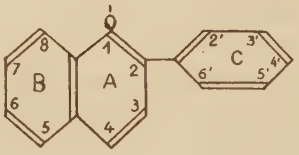
Il nous faut également noter que le noyau gamma pyrone, par l'oxygène de son cyle, possède des propriétés basiques (sels d'addition de l'oxygène devenant tétravalent).

B. — Les anthocyanes

Ils dérivent, eux aussi, du chromanne mais, cette fois-ci, la déshydrogénation totale du noyau pyronique aboutit au noyau benzopyroxonium.



De même que dans les flavones, leur radical phényle est substitué en 2.

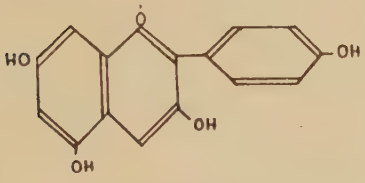


En outre, un certain nombre d'atomes d'hydrogène des noyaux A, B, C peuvent également être substitués par des

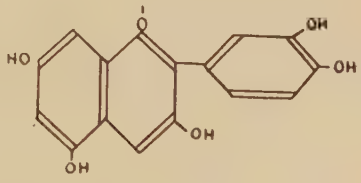
oxhydryles et, en fait, les anthocyanes sont des glucosides des sels du polyhydroxyphényl - 2 - phénopyrylium. Les hydroxyles sont presque toujours fixés sur les mêmes atomes d'hydrogène (3 du noyau A, 5-7 du noyau B, 3'-4'-5' du noyau C). Ces hydroxyles peuvent être méthoxylés (sauf ceux en 3, 5, 4' qui ne le sont jamais).

Les anthocyanes sont donc des dérivés du 3, 5, 7, 4' tétrahydroxy-2-phényl-phénopyrylium.

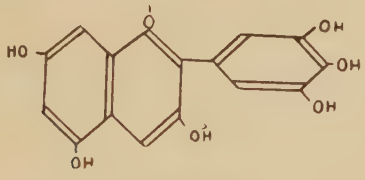
D'après le nombre des hydroxyles du noyau C, on décrit trois prototypes principaux d'anthocyanes : pélargonidol (1 OH en 4'), cyanidol (2 OH en 3'-4') et delphinidol (3 OH en 3'-4'-5'), auxquels on attribue donc les formules suivantes :



Pélargonidol



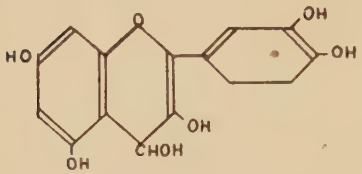
Cyanidol



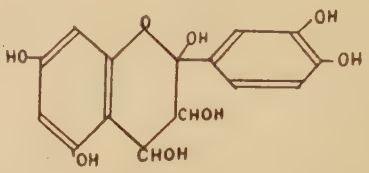
Delphinidol

A ces aglucones on donne le nom d'anthocyanidols; les hétérosides qui en dérivent se nomment anthocyanosides. Dans les tissus végétaux, ces différentes substances forment souvent des mélanges complexes rendant très difficiles l'extraction et l'identification de chacun des constituants. On y parvient grâce à la formation de sels de plomb, de picrates insolubles ou de chlorures cristallisés. La différenciation de deux de ces corps ne s'avère possible que dans leur état le plus pur.

Les anthocyanes peuvent exister, en outre, sous des formes modifiées, incolores. Ce sont, d'une part, les formes tautomères connues sous le nom de pseudobases et, d'autre part, les leucoanthocyanes. Ces derniers, extrêmement répandus dans le règne végétal, ont été découverts en 1920 par Rosenheim dans les feuilles de la vigne [40]



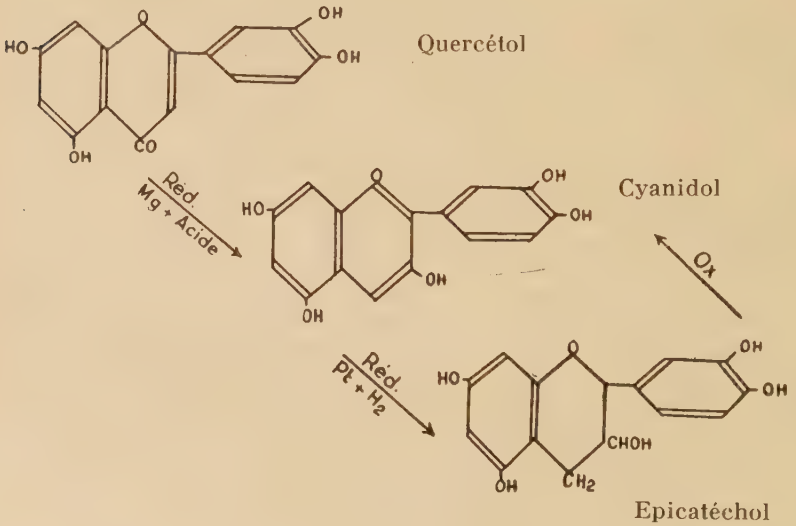
Pseudobase du cyanidol



Leucoanthocyane du cyanidol

Par leur union avec le glucose, le rhamnose ou le galactose, les anthocyanidols forment des mono ou des diglucosides. L'ose se fixe toujours en 3 dans le cas des monoglucosides. Chez les diglucosides, la deuxième molécule d'ose est fixée sur le carbone 5.

Rappelons, enfin, que les anthocyanes, par leur état d'oxydation, représentent le terme de passage des flavones aux catéchols.



Expérimentalement, il est facile de passer du quercétol au cyanidol par réduction ménagée; une réduction plus énergique aboutit à l'épicatéchol [13]. Inversement, l'oxydation du catéchol fournit aisément du cyanidol.

En raison de l'étroite analogie de structure propre à ces substances, il n'est pas étonnant de les rencontrer côte à côte dans la plupart des tissus colorés des végétaux. Les catéchols ne contribuent d'ailleurs que pour une faible part à la coloration totale, sauf lorsqu'ils se transforment en produits condensés du type phlobaphène. On retrouve encore le squelette des catéchols dans les divers tannins condensés dits « catéchiques », dont la structure chimique exacte demeure mal précisée.

II. — ÉTUDE DES COLORANTS DU VIN ROUGE

Les composés phénoliques du vin rouge, qui proviennent des épicarpes et des rafles, appartiennent aux trois groupes de substances que nous venons d'étudier : flavones, anthocyanes et catéchols.

Flavones et antocyanes représentent la « matière colorante » proprement dite; les composés catéchiques, pratiquement incolores, constituent les « matières tannoïdes ». Certains auteurs décrivent encore, de nos jours, sous le nom de « tannoïdes » l'ensemble des polyphénols colorés ou non. Cette terminologie nous paraît absolument impropre; elle contribue, par son ambiguïté, à rendre encore plus difficile l'étude déjà très compliquée de ces diverses substances. Nous pensons que le terme « tannoïde » ne doit servir à désigner que des substances complexes renfermant au moins un constituant tannique (définition due à Goris [34]). Il ne s'applique donc nullement aux flavones et aux anthocyanes.

A. — Les flavones

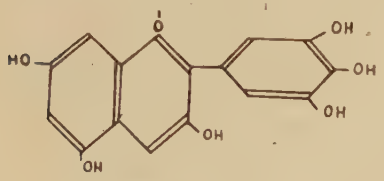
On ne doute plus, à l'heure actuelle, de la présence de pigments flavoniques dans le vin rouge. Le fait est signalé par de très nombreux auteurs. Toutefois, fort peu de recherches personnelles ont été effectuées en ce domaine, et l'on se contente invariablement de citer un travail déjà ancien de Fellenberg [11] selon lequel les vins rouges renfermeraient de 30 à 50 mg par litre de quercitroside. Rappelons que le quercitroside est le 3-rhamnoside du quercétol. A côté de l'hétéroside, existerait une très petite quantité d'aglucone libre.

Des recherches en cours ont permis récemment à Masquelier et Point [28] de vérifier la présence, dans divers vins rouges, d'un hétéroside flavonique. Les vins sont tout d'abord soumis à un épuisement prolongé à l'éther, dans l'appareil de Hagen. On enlève de cette façon les tannins et les aglucones flavoniques. Le vin subit ensuite une hydrolyse chlorhydrique, immédiatement suivie d'une nouvelle extraction par l'éther. Ce dernier dissout alors un flavonol qui n'est autre que le quercétol. La nature de la copule glucidique est encore à l'étude. Les mêmes auteurs ont réussi à identifier, en outre, du quercétol libre et une flavannone dans les vins soumis à leurs investigations. Ces divers pigments ne proviennent certainement pas des épicarpes, où leur présence n'a pu être contrôlée, mais sans doute sont-ils apportés par la rafle ou les pépins.

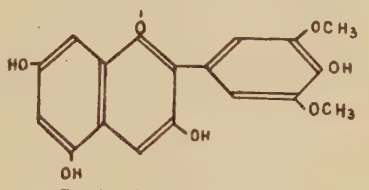
Quelle que soit leur nature, les pigments flavoniques ne constituent, pour les vins rouges, qu'une infime partie de la matière colorante. Il faut retenir, cependant, que les aglucones sont solubles dans l'éther et l'acétate d'éthyle, alors que les hétérosides ne sont extraits que par l'éther acétique seul.

B. — Les anthocyanes

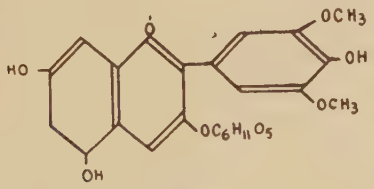
Contrairement à ce que nous avons vu à propos des flavones, les anthocyanes du raisin et du vin ont fait l'objet de recherches chimiques approfondies. Nous ne ferons que citer les précurseurs : Vogel [49], Glénard [19], Neubauer [33], Gautier [16], Laborde [24], pour nous étendre plus à loisir sur les travaux de Willstaetter et son école. C'est en 1915 que Willstaetter et Zollinger [54] étudient la constitution chimique du colorant des raisins rouges. Ils l'identifient à un anthocyanoside dont l'aglucone n'est autre que le syringidol (diméthyldelphinidol), déjà connu, et le sucre, du glucose. Pour indiquer l'origine du pigment, le nom d'œnoside lui est attribué (œnidol pour l'aglucone), ce qui ne fait qu'encombrer un peu plus la nomenclature de ces composés.



Delphinidol



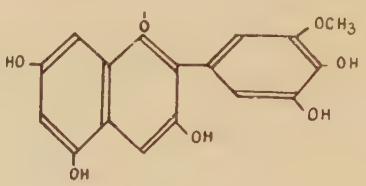
Syringidol ou Œnidol



Œnoside

En 1916, de nouveaux travaux des mêmes auteurs [55] établissent que le colorant des raisins rouges forme un mélange de diglucoside, de monoglucoside et d'aglucone en proportions variables selon les cépages. Le monoglucoside domine toujours. Ses dérivés diméthoxylés représentent 70 à 90 p. 100 du bloc anthocyanique; le reste, soit 10 à

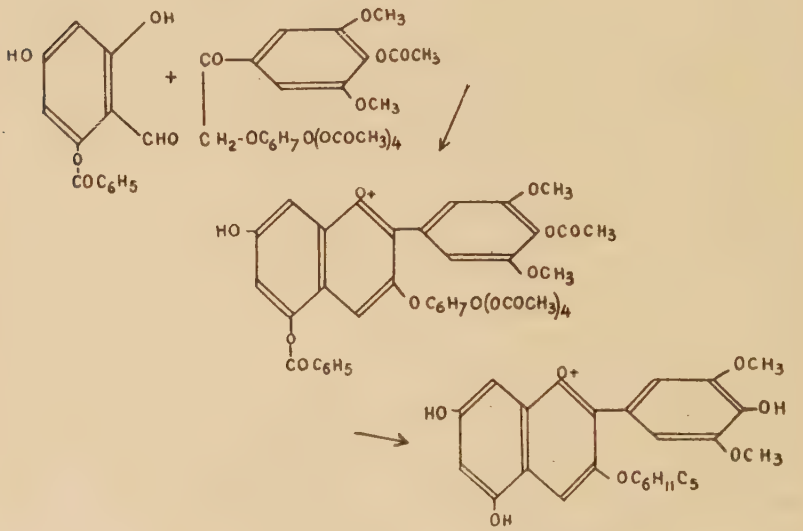
30 p. 100, consiste en dérivés monométhoxylés du type pétunidol (monométhyldelphinidol).



Dans les cépages américains, en revanche, les anthocyanes monométhoxylés prédominent nettement.

En 1927, Karrer [22] établit avec certitude la position des méthoxygroupes dans la molécule de l'œnidol, et adopte la formule actuellement en vigueur.

En 1931, Lévy, Posternak et Robinson [26] effectuent la synthèse de l'œnoside et confirment qu'il s'agit bien du 3-glucoside du syringidol. L'hétéroside est obtenu en condensant l'orthobenzoylphloroglucinaldéhyde avec l'ω-orthotétra-acétyl-β-glucosidoxy-4-acétoxy-3-5-diméthoxy-acétophénone. Après saponification du dérivé acétylé, on recueille l'œnoside.



Œnoside

Dans les vins, la séparation entre glucosides anthocyaniques et aglucones peut s'effectuer par l'alcool amylique. Les diglucosides sont insolubles dans cet alcool; les monoglucosides se laissent extraire si l'on sature le vin de chlorure de sodium; quant aux aglucones, elles y sont solubles d'emblée [55].

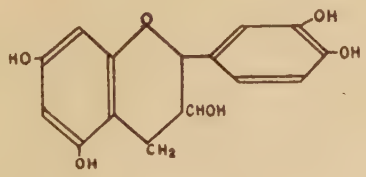
Selon les auteurs soviétiques (Williams et Taranova [50]), la séparation de l'œnidol et de l'œnoside dans les vins s'opère facilement par chromatographie sur coton hydrophile.

Enfin, il peut exister dans le vin rouge, à côté des pigments que nous venons d'énumérer, une certaine quantité de leuco-anthocyane, peut-être identique au produit étudié par Rosenheim dans les feuilles de vigne à l'automne [40]. Certains œnologues l'affirment : Tchogovadze, en particulier, a trouvé dans la pulpe incolore des raisins rouges une substance se transformant en sel d'oxonium rouge, par chauffage en présence d'acide chlorhydrique [47].

C. — Composés catéchiques

Ils constituent ce que l'on peut appeler la matière tannoïde proprement dite. Bien que la nature exacte du tannin des vins rouges ne soit pas encore élucidée, on a de bonnes raisons de penser qu'il s'agit d'un mélange dans lequel ce genre de corps existe en large excès (Nègre).

Les tannins catéchiques, ou tannins condensés, dérivent de la catéchine, selon Freudenberg [14].



Catéchine

Comme elle, ils se transforment en ploroglucine et acide

protocatéchique, par fusion alcaline. Il s'agit de molécules très étroitement voisines des anthocyanes et des flavones. D'ailleurs, Russel et Todd [42] ont pu obtenir par synthèse des substances présentant la plupart des caractères des tannins catéchiques en partant du 4-hydroxyflavanne.

Dans les vins rouges, on ne peut guère utiliser que des différences de solubilité pour séparer le tannin de la matière colorante. Et encore, n'y parvient-on que très imparfaitement.

Ribéreau-Gayon et Maurie ont préconisé, en 1942, l'extraction par l'acétate d'éthyle [38]. Mais ce solvant dissout un peu de colorant rouge, et laisse dans le vin une fraction que Nègre [32] considère comme un tannin puisqu'elle floculе la gélatine. En outre, les flavonosides passent facilement dans l'éther acétique et viennent souiller l'extrait.

Peynaud et Maurie, plus récemment, ont étudié l'extraction des matières tannoïdes du vin par l'éther sulfurique, au moyen de l'appareil de Hagen [30]. L'éther enlève au vin davantage de composés phénoliques et n'entraîne ni le colorant rouge ni les flavonosides. Peut-on affirmer qu'il prive le vin de la totalité de son tannin ? Nous ne le pensons pas, car rien ne prouve que toute la matière tannoïde soit soluble dans l'éther. En tout cas, la plupart des tannins catéchiques s'y montrent insolubles. Cependant, l'éther fournit un extrait nettement plus pur que le résidu abandonné par l'acétate d'éthyle. Tout au plus, peut-il être souillé par des traces d'aglucone flavonique et de pseudo-bases anthocyaniques souvent présentes dans les vins rouges.

CHAPITRE II

RECHERCHE DU PRINCIPE BACTÉRICIDE DES VINS ROUGES

Par analogie avec les conclusions du travail de LANCEPLEINE sur le pouvoir bactéricide des vins blancs, nous avons orienté nos recherches sur la fraction polyphénolique des vins rouges. Mais nous venons d'entrevoir, au chapitre précédent, quel mélange complexe forment ces substances. Il fallait, de toute évidence, simplifier le problème pour essayer de le résoudre. Aussi, avons-nous tout d'abord essayé de montrer que le pouvoir bactéricide des vins rouges était bien dû au bloc des polyphénols totaux, sans préciser la nature du constituant le plus actif. Ces recherches font l'objet du présent chapitre, dans lequel nous décrivons successivement la technique bactériologique mise en œuvre, le procédé utilisé pour priver le vin de ses polyphénols et les résultats obtenus en remettant ces substances en solution.

I. — DESCRIPTION DES TECHNIQUES BACTÉRIOLOGIQUES

Les travaux déjà cités et les recherches effectuées par LANCEPLEINE montrent que, parmi les Entérobactériacées soumises à l'action des vins, *Salmonella paratyphi* A s'avère la plus sensible; viennent ensuite, par ordre décroissant : *Salmonella paratyphi* B, *Eberthella typhosa* et, enfin,

Escherichia coli. Cette dernière espèce, la moins dangereuse à manipuler au laboratoire, a été retenue comme organisme test pour l'ensemble de nos travaux. La souche d'*Escherichia coli* utilisée fut isolée de l'urine d'un individu atteint de pyélonéphrite. Elle répond en tout point à la description qui figure au manuel de Bergey [3]. Nous avons vérifié que les résultats obtenus avec cette souche pouvaient être généralisés aux deux autres espèces citées plus haut, en ce sens que tout produit présentant une action bactéricide sur *Escherichia coli* détruit à fortiori les différents bacilles typhiques.

Parmi les nombreuses techniques utilisables pour vérifier l'action du vin sur les bactéries, nous avons choisi celle qui répondait le mieux à la nature de nos recherches et satisfaisait aux trois obligations suivantes :

1° Apprécier une action *bactéricide* et non une simple bactériostase;

2° Utiliser une densité bactérienne voisine des conditions naturelles de pollution des eaux, afin que nos résultats conservent une signification au point de vue hygiène alimentaire (vin souillé par une eau non potable; eau polluée à rendre potable par mélange avec du vin) ;

3° Donner un résultat *qualitatif* puisqu'il s'agit d'essais préliminaires, mais avec une indication sommaire de l'importance des deux facteurs suivants :

— Concentration du principe actif;

— Temps nécessaire pour obtenir un effet bactéricide.

A. — Principe de la technique

Le vin ou la solution à étudier, ainsi que leur dilution au demi et au quart dans l'eau distillée, reçoivent un inoculat standardisé, tel que la densité bactérienne finale soit d'environ 100 *Escherichia coli* par cm^3. Après quinze et trente minutes de contact, on prélève 0,5 cm^3 du mélange que l'on porte dans 10 cm^3 de bouillon nutritif. Les sub-

cultures ayant séjourné vingt-quatre heures à l'étuve à 37° C. permettent d'apprécier le pouvoir bactéricide du produit essayé :

— Subculture négative : action bactéricide;

— Subculture positive : présence de bactéries survivantes dans l'inoculat, donc : action nulle ou seulement bactériostatique.

B. — Préparation de l'inoculat

On utilise une culture de vingt-quatre heures sur gélose nutritive. Une anse de cette culture est introduite dans 5 cm^3 d'eau stérile. On obtient une suspension homogène en agitant le mélange avec des billes de verre. On dilue ensuite avec de l'eau stérile jusqu'à ce que l'opalescence soit identique à celle d'une suspension titrée à 400.000.000 de germes par cm^3 (antigènes étalons de l'Institut Pasteur). Par dilutions successives, on obtient finalement un mélange renfermant environ 1.000 germes par cm^3, utilisé comme inoculat standard.

C. — Essai de l'activité bactéricide

Le vin (ou la solution à étudier) est rendu stérile par filtration sur verre d'Iéna. Nous avons utilisé, au cours de ces recherches, des creusets en verre fritté G^4, montés sur rodages normalisés n° 3, s'adaptant sur une fiole à vide de 250 cm^3. Cet appareil est facile à stériliser au four Pasteur, et nous a toujours donné entière satisfaction pour la stérilisation des produits étudiés.

Le vin ainsi traité et ses dilutions au demi et au quart dans l'eau stérile, sont ensemencés avec un volume déterminé d'inoculat standardisé amenant la densité bactérienne à 100 *Escherichia coli* par cm^3. Après quinze, trente et parfois soixante minutes de contact à la température du laboratoire, on prélève 0,5 cm^3 de ces divers mélanges pour

ensemencer des tubes de bouillon nutritif renfermant 10 cm³ du milieu suivant :

Extrait de viande		5 g
Peptone		20 g
ClNa		8 g
Eau	q. s. p.	1.000 cm³

On ajuste à *p*H 7,2.

Les tubes de bouillon sont portés à l'étuve à 37° C. pendant vingt-quatre heures.

II. — LE VIN, PRIVÉ DE SES POLYPHÉNOLS, PERD SON POUVOIR BACTÉRICIDE

Un vin rouge de Bordeaux, stérilisé par filtration et ensemencé selon le protocole fixé plus haut, se comporte de la façon suivante :

TABLEAU I

VIN	SUBCULTURES	
	Après 15 mn.	Après 30 mn.
Vin pur	—	—
Vin dilué au demi	—	—
Vin dilué au quart	+	—

Après quinze minutes de contact avec les bactéries, le vin pur et sa dilution au demi stérilisent l'inoculat (subcultures négatives). Le vin dilué au quart laisse des bacilles en survie (subculture positive). Après trente minutes de contact, l'inoculat est stérilisé partout.

Agitons 50 cm³ de ce même vin avec 2 g de charbon végétal pendant cinq minutes, et centrifugeons. Nous obtenons un liquide surnageant complètement décoloré. Ensemençons-le comme nous l'avons fait précédemment pour le

vin rouge. Le tableau II nous montre les résultats de cette seconde expérience.

TABLEAU II

SURNAGEANT	SUBCULTURES	
	Après 15 mn.	Après 30 mn.
Pur	+	+
Dilué au demi	+	+
Dilué au quart	+	+

Après décoloration par le charbon végétal, le pouvoir bactéricide du vin rouge disparaît.

Cette expérience, bien que très simple, permet de réfuter un certain nombre d'hypothèses concernant ce phénomène.

Il semble, en effet, impossible, dès à présent, d'attribuer l'action microbicide du vin rouge soit à l'alcool, soit aux acides qu'il renferme, puisque le surnageant conserve la totalité de ces constituants. Le *p*H lui-même ne varie que d'un dixième d'unité au cours de la décoloration. (Ceci n'est vrai qu'à la condition d'utiliser la quantité de charbon juste suffisante pour assurer la décoloration. Un excès de charbon modifierait à coup sûr la composition du surnageant [1].)

En revanche, on peut vérifier facilement l'absence de polyphénols dans le vin décoloré :

1° On ajoute 20 p. 100 d'acide chlorhydrique pur :

— Pas de coloration rouge immédiate : absence d'anthocyanes et de pseudobases;

— Pas de coloration rouge ni de précipité brunâtre après cinq minutes d'ébullition : absence de leuco-anthocyanes et de catéchols condensés.

(1) Au moment où nous écrivions ces lignes, nous avons eu connaissance du travail de Draczynski [10], nouveau plaidoyer en faveur de l'action bactéricide de l'alcool et des acides du vin. Fait important à noter pour la suite de notre ouvrage, l'auteur signale qu'un vin peut présenter une vertu bactéricide seize fois plus forte que le moût initial.

2° A une autre portion du même produit on ajoute quelques gouttes d'ammoniaque :

— Pas de coloration jaune : absence de flavones.

Tout se passe donc comme si le vin devait son pouvoir bactéricide à la présence des polyphénols, ou plus exactement *à un facteur adsorbé sur le charbon*. Pour vérifier la valeur de cette hypothèse, il reste à démontrer que les substances fixées au charbon sont bien responsables du phénomène.

III. — LE POUVOIR BACTÉRICIDE SE RETROUVE PARMI LES SUBSTANCES ADSORBÉES

Après avoir décoloré le vin dans les conditions fixées précédemment, nous pouvons reprendre le culot de charbon végétal et le traiter de telle façon que les diverses substances adsorbées repassent en solution dans l'eau distillée. Ces opérations seront décrites à la fin du présent chapitre. Notons simplement, pour l'instant, qu'en vue d'obtenir une solution limpide, il faut amener le mélange au *p*H initial du vin, par addition de quelques gouttes d'acide acétique, sous contrôle de l'appareil à électrode de verre.

Comment va se comporter cette solution artificielle des polyphénols à l'égard du colibacille ? Après filtration sur verre d'Iéna, nous la soumettons au test bactériologique habituel. Le tableau III nous fournit la réponse :

TABLEAU III

SOLUTION DES POLYPHÉNOLS	SUBCULTURES	
	Après 15 mn.	Après 30 mn.
Pure	—	—
Diluée au demi	—	—
Diluée au quart	+	+

La solution pure (c'est-à-dire amenée au volume initial du vin) et sa dilution au demi ont stérilisé l'inoculat après quinze minutes de contact.

Diluée au quart, la solution des polyphénols ne manifeste plus d'activité dans les conditions de l'expérience.

Si l'on compare ces résultats à ceux exprimés au tableau I, on constate que le retour en solution aqueuse des substances adsorbées fait réapparaître le pouvoir bactéricide. C'est donc bien parmi ces substances qu'il faut essayer d'identifier le facteur responsable du phénomène.

Toutefois, on enregistre, dans cette dernière expérience, une certaine diminution de l'activité antimicrobienne, puisque la dilution au quart s'avère inactive. On peut se demander si cette baisse d'activité répond à une altération du facteur spécifique au cours des opérations d'élution ou bien au fait que, dans le vin, ce facteur voit son pouvoir renforcé par l'alcool. Nous avons pu facilement montrer que la seconde hypothèse ne pouvait prévaloir : si l'on amène la solution aqueuse des polyphénols au titre alcoolique primitif du vin, on ne constate aucune augmentation de l'action antiseptique. Une étude détaillée des conditions d'élution va nous permettre, en revanche, d'accorder plus de crédit à la première hypothèse.

IV. — ÉTUDE DE L'ÉLUTION

Nous ne décrirons pas les nombreux essais qui ont précédé la mise au point de la technique définitive. En ce domaine, on ne peut guère se fier à des règles absolues, seul le tâtonnement permet d'aboutir à un résultat.

A. — Technique de l'élution

On décolore 100 cm^3 de vin rouge en l'agitant pendant cinq minutes avec 4 g de charbon végétal purifié (pour des vins très riches en pigments, la décoloration ne sera parfaite qu'avec une quantité supérieure de charbon; un essai

préliminaire fixera la dose à employer). On centrifuge le mélange pendant cinq minutes à 5.000 tours/minute. Le surnageant est décanté et l'on remet le culot en suspension dans l'eau distillée. Une nouvelle centrifugation permet d'obtenir un sédiment débarrassé des constituants non adsorbés. Le charbon est alors trituré avec un égal volume de sable blanc lavé aux acides, et la masse ainsi préparée est soigneusement essorée au papier Joseph. On l'introduit à ce moment dans une allonge à chromatographie, en évitant de tasser trop fortement la colonne. Pour éliminer les dernières traces d'eau, on fait tout d'abord passer environ 5 cm^3 d'éther anhydre : quelques gouttes d'eau s'écoulent de la colonne. On les rejette, puis l'élution proprement dite s'effectue avec un mélange d'alcool absolu, d'éther anhydre et d'acétone anhydre à volumes égaux. En général, 30 cm^3 de ce mélange suffisent à éluer les pigments de 100 cm^3 de vin. Le solvant est finalement chassé par évaporation dans le vide et l'on recueille un résidu sirupeux rouge foncé.

B. — Contrôle de l'éluat

Deux séries d'essais doivent, d'une part, établir que l'éluat renferme bien les divers polyphénols retirés du vin, et, d'autre part, préciser le rendement de l'opération.

1° *Essais qualitatifs*

Le résidu d'élution est lavé à plusieurs reprises par l'acétate d'éthyle.

a) *L'insoluble,* constitué par la fraction anthocyanique, est repris par l'acide chlorhydrique à 1 p. 100. En se basant sur les caractères de solubilité dans l'alcool amylique, on identifie successivement un anthocyanidol et un anthocyanoside.

b) *L'acétate d'éthyle,* évaporé à sec, laisse un résidu que l'on épuise par *l'éther. L'insoluble* donne la réaction des

flavonols (coloration jaune intense avec l'ammoniaque, formation d'anthocyanidol par l'hydrogène naissant). La *solution éthérée,* évaporée, abandonne les tannins, caractérisés par leur réaction colorée en présence de sels de fer.

On retrouve donc dans l'éluat les trois types de polyphénols déjà identifiés dans le vin.

2° *Essais quantitatifs*

Parmi les diverses méthodes utilisées en œnologie pour le dosage des polyphénols, nous avons choisi la détermination de *l'indice de permanganate,* préconisée par plusieurs auteurs en raison de sa facilité d'exécution [38, 32]. Nous n'ignorons pas le manque de spécificité de cette technique, mais en l'appliquant successivement au vin désalcoolisé, au surnageant décoloré et à sa solution reconstituée des polyphénols, nous éliminons les principales causes d'erreurs, puisque nous opérons par différence.

Rappelons que l'indice de permanganate d'un vin représente le taux de substances oxydables à froid par la solution N/100 de MnO_4K, en présence d'une solution sulfurique de carmin d'indigo comme indicateur. On l'exprime en milliéquivalents de permanganate par litre de vin.

En général, les vins rouges utilisés pour nos essais présentaient un indice oscillant entre 75 et 120. Après décoloration, le surnageant consommait encore 4 à 8 milliéquivalents de permanganate. Quant à la solution des polyphénols, son indice s'est toujours montré bien inférieur au chiffre théorique puisqu'il variait entre 40 et 60.

Comment expliquer cet écart considérable ? Certes, il reste encore des polyphénols fixés au charbon. Un lavage prolongé de la colonne libère en effet un peu de colorant, mais en quantité trop faible pour fausser à ce point les résultats.

Nous pensons plutôt que les polyphénols se dégradent rapidement, par oxydation, dès qu'on les extrait du vin, ce qui se traduit par une baisse sensible du pouvoir réducteur.

Le charbon végétal, utilisé comme adsorbant, n'est certainement pas étranger à ce phénomène. Malheureusement, c'est le seul produit compatible avec les essais bactériologiques utérieurs, car il n'amène dans le milieu aucune substance venant interférer dans le métabolisme des germes.

Nous avons essayé d'isoler les polyphénols en traitant le vin par l'acétate basique de plomb; on libère ensuite les polyphénols de leur combinaison métallique par l'acide sulfurique dilué. On obtient ainsi une solution dont l'indice de permanganate atteint 75 et même 80 p. 100 de la valeur théorique. Le rendement est donc meilleur, mais les traces de plomb présentes dans cette solution faussent les tests bactériologiques. Désire-t-on éliminer ces traces de métal : la purification entraîne aussitôt une dégradation quasi totale des polyphénols. Malgré son mauvais rendement, la méthode au charbon végétal reste donc la mieux adaptée aux recherches que nous avons entreprises.

L'étude de l'élution permet ainsi d'expliquer la légère diminution du pouvoir bactéricide signalée au tableau III. Vraisemblablement, le facteur antiseptique du vin subit une altération lorsqu'il se fixe sur le charbon.

V. — CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Un vin rouge décoloré par le charbon perd son pouvoir bactéricide. Ce dernier se trouve en partie restauré lorsque les substances fixées au charbon sont remises en solution dans l'eau. L'hypothèse formulée au début du chapitre trouve ainsi sa confirmation : le pouvoir bactéricide réside dans l'une des substances adsorbées. Tout porte à croire qu'il s'agit d'un polyphénol, mais rien, jusqu'à présent, ne le prouve de façon formelle. La suite de nos recherches viendra préciser la nature de la substance en cause.

CHAPITRE III

IDENTIFICATION DU PRINCIPE BACTÉRICIDE

Bien que les expériences relatées au chapitre II nous donnent de fortes raisons d'attribuer le pouvoir bactéricide des vins rouges aux constituants polyphénoliques, cette hypothèse ne sera pleinement vérifiée que par l'isolement et l'identification du principe actif. Tout se passerait de façon identique si l'action antimicrobienne était due à quelque substance non identifiée accompagnant les polyphénols au cours de leur extraction. En effet, on connaît encore mal la composition chimique du vin; le moût, mélange déjà fort complexe, subit pendant la fermentation alcoolique un remaniement biochimique considérable. En outre, le métabolisme des diverses levures et micro-organismes qui participent à l'élaboration du vin déverse dans le milieu une foule de substances chimiques nouvelles parmi lesquelles se trouve peut-être le responsable du phénomène qui nous intéresse. L'exemple des antibiotiques d'origine fongique ou bactérienne montre qu'au cours de tels processus, des traces de substances à pouvoir hautement bactéricide peuvent apparaître.

Il importe donc de contrôler l'action des polyphénols isolés et purifiés avant de leur attribuer une propriété qui peut s'avérer usurpée. Le travail de Lancepleine [25] a montré de façon suffisamment claire que les tannins et les

flavonols pouvaient être mis hors de cause, soit par inactivité spécifique, soit en raison de leur faible concentration dans les vins. C'est donc vers les anthocyanes qu'il faut se tourner pour résoudre le problème. Afin de simplifier les recherches, nous avons utilisé non pas les anthocyanes du vin, difficiles à extraire et à purifier, mais ceux que les raisins recèlent en abondance et dont l'isolement et la purification s'avèrent relativement aisés.

Ce sont des raisins rouges de cépage Petit-Verdot, prélevés dans le Médoc au moment des vendanges de 1952, que nous avons choisis pour effectuer les divers essais faisant l'objet du présent chapitre.

I. — EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES SUR LES RAISINS ROUGES

On sépare à la main l'épicarpe de la pulpe de chaque raisin. La pulpe est exprimée légèrement, pour ne pas écraser les pépins. Elle fournit un moût à peine teinté de rose. Les épicarpes sont lavés rapidement à l'eau, broyés avec du sable fin et mis à macérer pendant vingt-quatre heures dans le mélange suivant :

Acide chlorhydrique pur	0,5	cm³
Alcool à 95°	10	cm³
Eau distillée ..... q. s. p.	100	cm³

On exprime dans une gaze et soumet le jus à la centrifugation. On obtient ainsi une solution limpide, fortement colorée en rouge. Par comparaison au photomètre, on amène cette solution à l'intensité moyenne de coloration que présentent les vins rouges jeunes issus du même cépage, après la même acidification. Pour fixer les idées, 30 g d'épicarpes donnent 45 cm³ de liquide extractif ayant un indice de permanganate égal à 95.

Le moût et le liquide extractif sont ensuite amenés à

*p*H 3,5 et stérilisés par filtration. Soumis au test bactériologique habituel, ils donnent les résultats figurant au tableau IV :

TABLEAU IV

	SUBCULTURES		
	Après 15 minutes	Après 30 minutes	Après 1 heure
Moût pur	+	+	+
Moût dilué au demi	+	+	+
Moût dilué au quart	+	+	+
Liquide extractif pur	+	+	+
Liquide extractif dilué au demi	+	+	+
Liquide extractif dilué au quart	+	+	+

Même après une heure de contact, aucun pouvoir bactéricide ne se manifeste, ni dans le moût, ni dans la solution des polyphénols.

En ce qui concerne le moût, un tel résultat ne peut nous surprendre : il s'agit en fait d'un excellent milieu de culture pour de nombreuses espèces microbiennes. La solution extractive des polyphénols, en revanche, ne répond nullement à notre attente. Son *p*H, son degré alcoolique, sa coloration et son indice de permanganate se confondent pratiquement avec ceux d'un vin, mais la moindre action bactéricide ne peut y être décelée.

Deux hypothèses peuvent rendre compte de ce fait nouveau :

1° La substance responsable du pouvoir antiseptique du vin n'existe pas dans les raisins. Elle apparaît pendant la fermentation ou en cours de vieillissement;

2° Cette substance se présente dans les raisins sous une

forme dépourvue d'activité. La fermentation et le vieillissement l'amènent, dans le vin, sous sa modification active.

Ces deux hypothèses, diamétralement opposées, paraissent au premier abord aussi séduisantes l'une et l'autre. La première, toutefois, se prête assez mal aux recherches expérimentales, car elle ne laisse aucunement préjuger de la nature du principe actif. La seconde, au contraire, limite la recherche aux substances qui entrent dans la constitution du raisin. C'est dans ce sens que nous avons poursuivi nos travaux.

II. — EFFETS PRODUITS PAR L'HYDROLYSE

La solution extractive des polyphénols présente, comme nous l'avons déjà souligné, de nombreux caractères communs aux vins rouges. Elle diffère toutefois de ces derniers sur un point particulier : dans les épicarpes, et par suite dans l'extrait, les pigments anthocyaniques se présentent principalement sous forme d'hétérosides. Ainsi, pour le cépage Petit-Verdot, un dosage nous a montré que 90 p. 100 au moins de la coloration des extraits était due à un monoglucoside. Dans les vins, au contraire, par suite d'une hydrolyse naturelle, ces mêmes pigments se trouvent, pour une part plus ou moins grande, sous forme d'aglucone.

Dès lors, ne peut-on supposer qu'il existe un rapport entre le taux d'aglucone et l'apparition du pouvoir bactéricide ? Pour vérifier cette nouvelle hypothèse, nous avons soumis la solution des pigments à l'hydrolyse ménagée : ébullition en présence de 10 p. 100 d'acide chlorhydrique, pendant trois minutes, sous réfrigérant à reflux. Après le refroidissement, on porte le *p*H du liquide à 3,5 on centrifuge pour éliminer un dépôt rougeâtre insoluble, et le surnageant, stérilisé par filtration, subit le test bactériologique habituel.

La lecture du tableau V montre que l'hydrolyse a fait réapparaître le pouvoir bactéricide. Ce phénomène, con-

forme à notre hypothèse, suggère l'existence d'un rapport direct entre l'apparition des propriétés antiseptiques et la présence d'œnidol libre. D'autres expériences vont préciser ces premiers résultats.

TABLEAU V

LIQUIDE D'HYDROLYSE	SUBCULTURES		
	Après 15 minutes	Après 30 minutes	Après 1 heure
Pur	—	—	—
Dilué au demi	—	—	—

III. — PRÉPARATION ET ACTIVITÉ D'UN EXTRAIT PURIFIÉ

Nous avons renouvelé l'expérience précédente en opérant, cette fois-ci, non plus sur le mélange mal défini du liquide extractif, mais sur une fraction anthocyanique purifiée.

Pour éliminer les tannins et les catéchols de la solution primitive, nous avons adopté la technique proposée par Peynaud et Maurie, qui consiste à épuiser le mélange par l'éther, dans l'appareil de Hagen. On trouvera une description de cet appareil dans l'article de Peynaud [35].

Après six heures d'extraction continue, la solution est privée d'éther par agitation dans le vide. On la soumet ensuite à l'hydrolyse acide dans les conditions précédemment fixées. Enfin, on pratique sur la solution filtrée et stérilisée les essais bactériologiques dont les résultats figurent au tableau VI.

Cette expérience nous permet de cerner d'un peu plus près encore le problème à résoudre. Elle prouve que les tannins, les catéchols, et en général tout ce qui passe spontanément dans l'éther n'exercent aucun effet notable sur le

pouvoir bactéricide. Le rôle joué par l'œnidol dans ce phénomène se trouve donc, une fois encore, confirmé.

TABLEAU VI

Solution extractive purifiée et hydrolysée	SUBCULTURES		
	Après 15 minutes	Après 30 minutes	Après 1 heure
Pure	—	—	—
Diluée au demi	—	—	—
Diluée au quart	—	—	—

IV. — EFFETS PRODUITS PAR L'ÉLIMINATION DES FLAVONOLS

Nous avons déjà signalé, au chapitre premier, que l'extraction d'un vin rouge par l'éther dans l'appareil de Hagen laisse subsister, à côté des anthocyanes, un hétéroside flavonique dont l'aglucone, étudiée par Masquelier et Point, s'identifie au quercétol [28]. Ce flavonoside se rencontre également dans notre extrait d'épicarpes, et si l'on épuise à l'éther le jus d'hydrolyse de l'expérience précédente, on voit cet éther se colorer en jaune. Malgré la purification préalable dans l'appareil de Hagen, l'œnidol se trouve donc mélangé à une certaine quantité de flavonol. Cette substance participe-t-elle au pouvoir bactériologique que nous avons constaté ? Pour élucider ce point, nous avons réalisé l'expérience suivante : la solution extractive purifiée, sortant de l'appareil de Hagen, est hydrolysée; on divise le jus d'hydrolyse en deux portions, A et B, de volumes égaux. La fraction A n'est plus modifiée; la fraction B est épuisée à l'éther, qui s'empare du flavonol. On chasse l'éther dissous par agitation dans le vide. On soumet ensuite les deux solutions au test bactériologique habituel.

TABLEAU VII

	SUBCULTURES		
	Après 15 minutes	Après 30 minutes	Après 1 heure
Fraction A, pure	—	—	—
Fraction A, diluée au demi..	—	—	—
Fraction A, diluée au quart..	—	—	—
Fraction B, pure	—	—	—
Fraction B, diluée au demi..	—	—	—
Fraction B, diluée au quart.	+	—	—

Le tableau VII nous apprend que seule la subculture, après quinze minutes, de la fraction B diluée au quart se montre positive. Le départ du flavonol se traduit donc par une légère diminution du pouvoir bactéricide.

Il importe de souligner le résultat de cette expérience. En effet, on peut concevoir l'existence de produits naturels dans lesquels, à l'inverse de ce qui se passe pour les vins rouges, les pigments flavoniques existeraient en grand excès par rapport aux anthocyanes ou aux catéchols. Si l'on admet que les hétérosides flavoniques subissent, eux aussi, une hydrolyse naturelle enrichissant le milieu en aglucone, il faut s'attendre a constater l'apparition d'un pouvoir bactéricide dans de tels produits.

Chez les vins rouges, toutefois, la faible concentration des flavonosides ne laisse à ces pigments qu'un rôle minime dans l'élaboration des propriétés antimicrobiennes.

V. — ACTIVITÉ BACTÉRICIDE DE L'ŒNIDOL

Les résultats encourageants obtenus en éliminant les substances inactives de l'extrait pigmentaire nous ont incité à compléter ce travail par une étude du pouvoir bactéricide de l'œnidol isolé à l'état pur.

A. — Isolement de l'œnidol

On part de la solution extractive habituelle, épuisée à l'éther dans l'appareil de Hagen. L'addition d'une solution aqueuse saturée d'acide picrique amène la précipitation de l'œnoside. Le picrate impur est recueilli, lavé à l'eau glacée, séché et dissous dans une petite quantité de méthanol. Une impureté insoluble est éliminée. Au filtrat, on ajoute un excès d'éther anhydre, le picrate d'œnoside se dépose. On le dissout à nouveau dans le méthanol et le fait recristalliser en ajoutant une solution aqueuse chaude et saturée d'acide picrique. Pendant le refroidissement, le pigment cristallise sous forme d'aiguilles rouges floconneuses.

Du picrate, on passe au chlorure en dissolvant le produit dans du méthanol amené progressivement à la concentration de 5 p. 100 en gaz chlorhydrique sec. L'addition d'éther anhydre fait précipiter le pigment. On le purifie par dissolution dans l'acétone, filtration et précipitation par l'éther.

Le chlorure d'œnoside, hydrolysé en présence d'acide chlorhydrique dilué, passe à l'état d'œnidol (ébullition dans ClH à 10 p. 100 pendant trois minutes). L'aglucone se laisse extraire et purifier par l'alcool amylique. Des dissolutions successives dans l'alcool, suivies de filtration et de précipitation par l'éther, permettent d'obtenir une aglucone suffisamment pure.

L'hydrolyse ne s'accompagne pas de déméthoxylation, car le pigment, soumis au test de Willstatter et Mieg pour la recherche du delphinidol, donne une réaction négative [53].

B. — Détermination du coefficient-phénol de l'œnidol

Jusqu'à présent, nos essais bactériologiques s'appliquaient à des mélanges mal définis : seuls des tests qualitatifs s'avéraient utilisables. Avec une substance pure comme l'œnidol, il devient intéressant de mettre en œuvre des techniques plus précises, fournissant des réponses quantitatives. Parmi ces techniques, la détermination du coefficient-phénol a plus particulièrement retenu notre attention.

Principe. — On appelle coefficient-phénol d'une substance son pouvoir de destruction sur un micro-organisme déterminé, comparé à celui du phénol s'exerçant dans les mêmes conditions (test de Rideal et Walker [41]).

Toute la valeur de cette détermination repose évidemment sur la stricte identité des opérations effectuées au cours des deux essais.

Il faut en particulier standardiser avec soin les facteurs suivants :

1° La durée d'action des deux substances;

2° La température des milieux dans lesquels on les fait agir;

3° La nature de ces milieux (leur teneur en matière organique importe avant tout);

4° Le micro-organisme utilisé dans le test;

5° L'âge de la culture;

6° La valeur de l'inoculat;

7° La nature des milieux de subculture, leur volume et la température d'incubation;

8° Le délai de lecture des subcultures.

On calcule le coefficient-phénol en divisant la dilution la plus élevée de la substance produisant une subculture négative après dix minutes, mais positive après cinq minutes, par la dilution correspondante du phénol.

C. — Sensibilité de « Escherichia coli » au phénol

Nous avons utilisé la souche de colibacille ayant servi aux précédentes expériences.

Les cultures se font en eau peptonée à 20 p. 100, ajustée à *p*H 7,2. On ensemence 10 cm³ de ce milieu avec une anse d'une culture de vingt-quatre heures. Après vingt-quatre heures d'incubation à 37° C, cette nouvelle culture est diluée au 1/1.000e dans l'eau distillée stérile. A 5 cm³ des diverses dilutions de phénol, on ajoute 0,5 cm³ de la suspension bactérienne. Après cinq minutes et dix minutes de contact, on ensemence une anse de chaque mélange dans 10 cm³ d'eau peptonée. Tous les liquides et réactifs en expérience sont maintenus à 37° C, dans un bain-marie à thermostat. Les résultats, notés vingt-quatre heures après l'ensemencement, figurent au tableau VIII.

TABLEAU VIII

Tubes n°....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration en phénol..	1/200	1/250	1/260	1/270	1/280	1/290	1/300	1/310	1/320	1/330
Subcultures :										
après 5 mn.	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
après 10 mn.	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+

Le tube n° 7 renferme la dilution la plus élevée donnant une subculture positive après cinq minutes, et négative après dix minutes, soit 1/300. On retient cette dilution.

D. — Sensibilité de la souche a l'œnidol

On la détermine en même temps et dans les conditions absolument identiques. On dissout l'œnidol dans l'eau distillée et l'on amène le *p*H à 3,60 (valeur moyenne du

*p*H des vins rouges, correspondant à une solubilité optimum du pigment).

On stérilise la solution mère par filtration sur verre d'Iéna, et l'on établit une gamme de dilutions dans l'eau stérile. Le tableau IX nous donne les résultats de ce deuxième essai.

TABLEAU IX

Tubes n°....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Œnidol (μg/cm^3) ..	700	500	350	250	150	125	100	50	15	7-5
Subcultures :										
après 5 mn.	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
après 10 mn.	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+

On retiendra la dilution à 100 μg par cm^3, soit 1/10.000^e.

L'œnidol présente donc un coefficient-phénol égal à $\frac{10.000}{300}$, soit 33,3. Autrement dit, il se montre 33,3 fois plus actif que le phénol sur la souche utilisée, qu'il détruit encore à la dilution de 0,1 g par litre.

VI. — CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Les expériences effectuées sur la pulpe et l'épicarpe des raisins rouges Petit-Verdot montrent que, pour ce cépage, les baies arrivées à maturité ne renferment aucun constituant doué d'activité bactéricide. Toutefois, un extrait fortement coloré provenant de l'épuisement des épicarpes acquiert un pouvoir microbicide intense lorsqu'on le soumet à une hydrolyse acide ménagée.

Ce phénomène se montre en relation directe avec la transformation de l'œnoside inactif en son aglucone, l'œni-

dol, qui fait défaut dans les raisins utilisés pour nos essais. En effet, la détermination du coefficient-phénol de l'œnidol pur nous apprend que ce pigment, 33 fois plus actif que le phénol, détruit le colibacille à la dilution de 1 p. 10.000. Tout porte à croire que l'œnidol se confond avec le principe bactéricide des vins rouges.

CHAPITRE IV

ÉVOLUTION DU POUVOIR BACTÉRICIDE DES VINS ROUGES AU COURS DU VIEILLISSEMENT

Les recherches entreprises sur les pigments des raisins rouges ont permis, nous l'avons vu, de simplifier le problème de l'extraction et de l'identification du principe bactéricide.

Il importe à présent de vérifier que les résultats obtenus avec l'œnidol en solution pure se confirment lorsque cette aglucone agit dans son milieu naturel, le vin. En effet, si le pouvoir bactéricide des vins rouges répond bien, avant tout, à la présence de l'œnidol, toute modification qualitative ou quantitative des constituants anthocyaniques doit retentir sur ce phénomène. Aussi, avons-nous entrepris l'étude des variations de l'action antimicrobienne des vins en fonction du vieillissement, qui s'accompagne, on le sait, de transformations chimiques importantes des polyphénols. Avant d'énumérer les résultats expérimentaux, nous résumerons brièvement les travaux modernes concernant l'évolution de ces polyphénols dans les vins rouges.

I. — ÉVOLUTION DES POLYPHÉNOLS DANS LES VINS ROUGES

Le seul aspect d'un vin rouge permet à l'expérimentateur le moins sagace d'évaluer les effets du vieillissement sur la matière colorante. Sortant de la cuve, le vin présente une coloration rouge sombre intense, avec une composante bleuâtre souvent très nette. Quelques années plus tard, ce même vin, s'étant dépouillé, acquiert une teinte toute différente, faite d'un mélange harmonieux de rouge et de jaune qui aboutit au fameux « tuilé » si caractéristique.

Que sait-on des phénomènes chimiques responsables de cette évolution ? Tout d'abord, il faut poser en principe que la coloration d'un vin rouge n'est pas uniquement le fait de ses anthocyanes : même les polyphénols incolores y participent, en jouant le rôle de copigments. Le phénomène de la copigmentation, particulièrement bien étudiée par Robinson [39], fut remarqué dès 1915 par Willstatter et Mallison [52]. C'est ainsi qu'une solution rouge vif de chlorure d'œnoside subit un bleuissement très net par addition de traces de tannins ou de flavonols. Un grand nombre de substances présentes dans les vins peuvent agir en tant que copigments. Ce domaine reste encore à explorer, mais nous pouvons supposr que certaines variations enregistrées dans la coloration des vins proviennent de l'apparition ou de la destruction de copigments de l'œnoside.

Willstatter et Zollinger, qui ont isolé les premiers l'œnoside et l'œnidol des raisins rouges, constatent que, dans les vins, la matière colorante ne précipite plus par l'acide picrique et absorbe fortement les radiations violettes [55].

Génevois et Ribéreau-Gayon [17] citent, à propos des vins ayant au moins trois ans d'âge, les variations suivantes dans les propriétés du colorant :

1° Plus de décoloration par addition d'un excès de bisulfite;

2° Plus de réduction par l'hydrosulfite;

3° Meilleure solubilité dans l'acool amylique;

4° La matière rougeâtre précipitée par l'éther présente des indices de méthoxyle de plus en plus faibles;

5° Le colorant passe à l'état colloïdal, non dialysable sur collodion ou acétate de cellulose.

Les auteurs attribuent ces propriétés nouvelles aux transformations chimiques suivantes : l'œnoside s'hydrolyse peu à peu en œnidol; ces deux pigments perdent progressivement leurs groupes OCH_3; les orthodiphénols ainsi formés se combinent molécule à molécule, provoquant l'apparition d'agrégats qui grossissent jusqu'au passage à l'état colloïdal et finissent par précipiter. Par chauffage à 100° C, on accélère ce processus et le vin dépose en quelques heures.

Des dosages effectués par Ribéreau-Gayon [37], il ressort que le colorant des vins vieux présente un indice de méthoxyle de 3 à 4 p. 100, alors que l'œnidol en renferme théoriquement 11,7 p. 100. C'est donc le dérivé monométhoxylé du delphinidol qui prédominerait dans les vins conservés depuis quelques années; le groupe orthodiphénol ainsi apparu crée un état particulier d'instabilité de la molécule, en rapport avec sa facile oxydabilité.

Des recherches récentes, effectuées en U. R. S. S. par Dourmischidze (cité par Deibner [8]), démontrent également que l'œnidol apparaît au cours du vieillissement; la température élevée de la fermentation favoriserait l'augmentation de la fraction agluconique, de même que la pasteurisation ou un séjour prolongé à l'étuve.

Toutefois, l'auteur n'aurait pas constaté de diminution des indices de méthoxyles dans les vins rouges vieux; une partie du colorant précipite à la suite de modifications dont la nature n'est pas précisée; ce qui reste en solution serait constitué par de l'œnidol partiellement transformé en pseudobase, ce qui expliquerait la modification de couleur.

Avec les anthocyanes, d'autres polyphénols subissent dans le vin les effets du vieillissement : le tannin disparaît lente-

ment au cours de la conservation en bouteille; quant aux leucoanthocyanes, ce que l'on en sait à l'heure actuelle laisse supposer leur dégradation progressive et leur insolubilisation finale dans les vins vieux [46].

En résumé, les polyphénols représentent une fraction particulièrement instable parmi les constituants du vin. A partir du moment où ils entrent en solution dans le moût, ils ne cessent de participer à des phénomènes physicochimiques complexes et subissent des modifications lentes et continuelles. Parmi ces transformations, retenons celle qui nous intéresse le plus : l'apparition de l'œnidol par hydrolyse de l'œnoside. Il faut avouer que l'on connaît encore mal le comportement de ce pigment dans les vins. A quel moment atteint-il sa concentration maximum ? Celle-ci se maintient-elle de façon durable ? Arrive-t-il un moment où le vin ne renferme pratiquement plus d'aglucone ? On ne peut répondre de façon satisfaisante à ces diverses questions. C'est donc sans idées préconçues que nous aborderons les recherches expérimentales sur l'évolution du pouvoir bactéricide des vins au cours de leur vieillissement.

II. — POUVOIR BACTÉRICIDE ET VIEILLISSEMENT DES VINS

Nous préciserons tout d'abord le protocole expérimental de ces nouvelles recherches. Ensuite, nous exposerons les résultats obtenus.

A. — Techniques utilisées

Sur la plupart des vins examinés, nous avons effectué un certain nombre d'essais physicochimiques, dans l'espoir de rapporter à un facteur déterminé les variations éventuelles du pouvoir bactéricide.

1° *Détermination du pH* par l'appareil à électrode de verre;

2° *Dosage de l'acidité totale* avec le rouge de phénol fonctionnant comme indicateur externe, les résultats étant exprimés en milliéquivalents par litre;

3° *Indice de permanganate* exprimé en milliéquivalents de MnO_4K par litre;

4° *Essais photométriques :*

On pratique une première lecture sur la dilution suivante :

Vin		10 cm³
Acide chlorhydrique à 10 p. 100		2 cm³
Eau distillée	q. s. p.	100 cm³

On agite pendant une minute une portion de cette solution avec 1/5e de volume d'alcool amylique. On centrifuge et la phase aqueuse sert à une nouvelle lecture au photomètre.

La différence entre les deux absorptions permet d'apprécier grossièrement le taux d'aglucone, exprimé en divisions arbitraires de l'appareil.

5° *Essais chromatographiques :*

Méthode de Williams et Taranova [50], destinée à calculer le rapport $\frac{\text{œnidol}}{\text{œnoside}}$.

On utilise une colonne de coton hydrophile dégraissé à l'alcool-éther et séché à l'étuve. Après dilution au demi dans l'acide chlorhydrique a 2 p. 100, le vin est versé sur la colonne. L'élution de la fraction hétérosidique s'opère avec de l'eau amenée à *p*H 2 au moyen d'acide chlorhydrique; la fraction agluconique s'élue par l'alcool à 50 p. 100 acidifié au même *p*H. Les deux fractions sont amenées au même volume et au même titre alcoolique avant leur comparaison au photomètre.

6° *Essais bactériologiques :*

A part quelques essais préliminaires effectués selon la

méthode qualitative décrite au chapitre II, c'est la détermination du coefficient-phénol que nous avons adoptée comme test bactériologique. On stérilise d'abord les vins par filtration sur verre d'Iéna. On les dilue ensuite avec de l'eau distillée stérile, afin d'obtenir des mélanges à titres variés. On opère avec ces gammes de dilutions comme s'il s'agissait d'une solution pure d'œnidol (voir chapitre III). On retient la dilution la plus élevée produisant une subculture positive après cinq minutes et négative après dix minutes.

Le pouvoir bactéricide s'exprime à l'aide d'un indice propre à chaque dilution, selon le tableau suivant :

TABLEAU X

Dilution	Indice bactéricide
5 p. 100	20
10 —	19
20 —	17
30 —	15
40 —	13
50 —	11
60 —	9
70 —	7
80 —	5
90 —	3
100 —	1

B. — Variations dues aux cépages

Avant d'étudier l'action du vieillissement proprement dit, nous soulignerons une fois encore l'influence de la nature du cépage sur le pouvoir bactéricide. Il est bien évident que le phénomène qui dépend à la fois de la *qualité* des pigments et de leur *quantité*, se manifestera de façon très précoce dans les vins issus de cépages riches en aglucone libre. Inversement, certains cépages ne renfermant guère

que de l'œnoside retarderont l'apparition des propriétés germicides. C'est ainsi qu'un vin fortement coloré de cépage Teinturier s'est montré médiocrement actif sur les bactéries, car malgré sa richesse en pigments, il ne renfermait que très peu d'aglucone passant dans l'alcool amylique. Au contraire, un vin de Bordeaux de même âge, beaucoup moins coloré, agit encore à la dilution au quart, en raison de son taux élevé d'œnidol.

TABLEAU XI

VINS	SUBCULTURES	
	Après 15 minutes	Après 30 minutes
Cépage Teinturier pur	—	—
— — dilué au demi	+	+
— — dilué au quart	+	+
Bordeaux pur	—	—
— dilué au demi	—	—
— dilué au quart	—	—

C. — Influence de la fermentation

La fermentation alcoolique entraîne une hydrolyse appréciable de l'œnoside. Dès la sortie de la cuve, le vin rouge présente un certain pouvoir bactéricide, même pour les cépages ne renfermant que très peu d'œnidol libre.

Nous avons pu vérifier l'effet de la fermentation sur un moût de cépage Petit-Verdot. Une partie de ce moût ayant subi un arrêt de fermentation, nous constatons une stabilisation de l'indice bactéricide. Le vin ayant fermenté totalement s'avère plus actif.

TABLEAU XII

Cépage Petit-Verdot	Indice bactéricide
Moût non fermenté	Néant
Vin après arrêt de fermentation	15
Vin totalement fermenté	17

D. — Premiers essais sur l'action du vieillissement

Nous avons effectué ces premiers essais sur trois vins rouges de Bordeaux : un Pomerol et deux crus de Médoc. Les résultats se trouvent rassemblés au tableau XIII.

TABLEAU XIII

VINS	*p*H	Acidité totale (m. éq.)	Indice de permanganate (m. éq.)	Essai photométrique (taux d'aglucone)	Indice bactéricide
Pomerol 1952	3,95	54	65,5	18	11
— 1949	3,60	65	62,5	15	12
— 1943	3,75	71	62,5	30	17
Médoc I 1952	3,65	65	70	30	14
— 1949	3,40	85	75	23	14
— 1946	3,40	95	68,5	22	18
— 1943	3,50	93	65	20	16
Médoc II 1952	3,75	64	62,5	20	11
— 1949	3,65	76	77,5	10	11
— 1946	3,60	76	68,5	10	11
— 1943	3,65	84	70	20	11

Pomerol. — L'indice bactéricide croît régulièrement en fonction du temps. Il ne semble pas dépendre du *p*H ni de l'acidité totale. L'indice de permanganate varie nettement moins que le pouvoir bactéricide. Le dosage photométrique ne fournit pas de résultats bien nets.

Médoc I. — Ici encore, l'indice bactéricide suit le vieillissement. Un maximum semble toutefois atteint dans le vin de six ans. Cette variation ne se reflète nullement dans les autres tests.

Médoc II. — Ce vin conserve pendant neuf ans un indice bactéricide faible et constant. Il semble renfermer moins d'aglucone que les précédents.

De ces résultats, nous tirerons les conclusions suivantes :

1° Le pouvoir bactéricide semble indifférent aux variations du *p*H et de l'acidité totale;

2° L'indice de permanganate, qui représente le taux global de polyphénols, n'accompagne pas l'indice bactéricide dans ses fluctuations;

3° Il n'existe que des rapports très vagues entre le taux d'aglucone déterminé par photométrie après extraction amylique et le pouvoir bactéricide. On touche ici du doigt l'incertitude des dosages photométriques appliqués à des substances aussi fragiles que les anthocyanes. Si l'on ajoute à ce caractère de fragilité la possibilité d'une copigmentation difficile à déceler et l'altération de la coloration en fonction du temps, on se rend compte du peu d'intérêt que présentent de telles méthodes.

Un travail récent de Dourmischidze et Khatchidze [9] confirme notre opinion : comparant la méthode chimique de dosage de l'œnoside à la technique photométrique, les auteurs enregistrent les écarts suivants pour un même vin :

TABLEAU XIV

VINS du cépage Saperavi	ŒNOSIDE (en mg par litre)	
	Dosage chimique	Dosage photométrique
Année 1950	1.280	1.250
— 1949	868	176
— 1940	683	115,5
— 1931	545	75

Il est certain que, dans les vins vieux, la majeure partie de l'œnoside et de l'œnidol se trouve à l'état incolore. Le dosage photométrique s'avère donc inutilisable.

4° L'influence du vieillissement sur le pouvoir bactéricide paraît assez nette dans les deux premiers vins. Le troisième échantillon, en revanche, ne manifeste aucune variation en ce domaine, tout au moins pour un vieillissement de neuf ans. Ceci nous amène à souligner l'inconvénient qui découle de notre mode d'investigation. Dans l'impossibilité de suivre l'évolution d'un même vin pendant de nombreuses années, nous avons étudié l'effet de la conservation sur des années différentes d'un même cru. Mais nous comparons entre eux des vins forcément très différents, dont nous ignorons le passé et les conditions de conservation. D'autres expériences, s'étendant sur une plus longue durée, devront préciser les résultats de ces premiers essais.

E. — Evolution d'un même vin pendant quatre-vingts ans

Nous avons pu déterminer le pouvoir bactéricide d'un vin de Médoc sur treize échantillons allant de 1949 à 1870. Les résultats figurent au tableau XV.

TABLEAU XV

Année	*p*H	Acidité totale (m. éq.)	Indice de MnO_4K	Œnidol / Œnoside	Indice bactéricide
1949....	3,40	73	59	1	14
1948....	3,30	80	71	1,1	16
1947....	3,40	72	68,5	1,7	16
1946....	3,30	82	65	1	16
1943....	3,35	67	60	0,6	19
1942....	3,30	69	77,5	0,75	19
1938....	3,55	68	70	1,1	17
1929....	3,70	70	67,5	1	16
1923....	3,55	67	65	1	16
1916....	3,40	74	70	1,1	16
1906....	4	58	62,5	1	12
1896....	3,60	77	42,5	0,9	9
1870....	3,70	72	50	0,8	6

Comme dans les essais précédents, on ne peut rien conclure des variations du *p*H, de l'acidité totale et de l'indice de permanganate.

A l'extraction de l'œnidol par l'alcool amylique, nous avons substitué la méthode chromatographique de Williams et Taranova [50], suivie d'une lecture photométrique.

On voit que le rapport $\frac{\text{œnidol}}{\text{œnoside}}$ ne varie que dans d'étroites limites, et souvent en sens inverse de l'indice bactéricide (vins des années 1942 et 1943). Dans le cas des vins vieux, la méthode chromatographique ne présente donc aucun avantage sur les techniques anciennes; elle se heurte aux mêmes obstacles déjà signalés; on ne peut se fier à un dosage photométrique quand il s'agit de colorants aussi instables que les anthocyanes.

Seul *l'indice bactéricide* accuse des variations qui semblent étroitement liées au vieillissement. Le pouvoir antiseptique, représenté par l'indice 14 dans le vin de quatre ans, atteint un maximum de 19 dans les vins de sept et dix ans. Il se stabilise ensuite, pendant environ vingt-cinq ans, à la valeur 16. Enfin, très lentement, il s'atténue et, dans le vin de quatre-vingt-trois ans, ne représente plus que le tiers de la valeur maximum.

F. — Action de la chaleur sur le pouvoir bactéricide

Le chauffage des vins accélère, on le sait, les réactions d'hydrolyse. Mais Williams et Taranova ont montré, en 1950, que des températures relativement peu élevées provoquaient une destruction de l'œnoside l'emportant en vitesse sur sa transformation en aglucone [50]. Ainsi, un vin de cépage Saperavi de 1949, qui renferme 616,8 mg d'anthocyanes par litre, ne contient plus que 39 mg de pigments après un chauffage de quinze jours à 48° C.

Nous avons vérifié l'action d'un tel traitement sur le pouvoir bactéricide des vins de Bordeaux.

TABLEAU XVI

VINS	CHAUFFAGE	INDICE de MnO_4K		INDICE BACTÉRICIDE	
		AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS
Médoc 1948.....	15 jours à 37° C.	71	62	16	12
Castillon 1953....	8 jours à 56° C.	52	47	9	1

Un chauffage modéré entraîne donc une diminution rapide du pouvoir bactéricide. On peut supposer que le chauffage provoque une isomérisation qui amène l'œnidol sous une forme inactive. L'indice de permanganate, bien que diminué, ne reflète qu'imparfaitement la transformation des propriétés antiseptiques de l'aglucone.

III. — CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Tout ce qui vient modifier la *quantité* d'aglucone ou en altérer la *qualité* exerce une influence sur le pouvoir bactéricide des vins rouges. En particulier, de faibles valeurs de l'indice bactéricide se rencontrent :

1° Dans les vins jeunes;

2° Dans les vins de cépages pauvres en aglucone libre;

3° Dans les vins ayant subi un arrêt de fermentation;

4° Dans les vins extrêmement âgés;

5° Dans les vins chauffés.

Cet indice atteint au contraire des taux élevés :

1° Dans les vins issus de cépages déjà riches en aglucone libre;

2° Dans les vins ayant fermenté normalement;

3° Dans les vins vieux en bon état de conservation.

Pour un vin déterminé, on enregistre des variations considérables du pouvoir bactéricide en fonction du temps.

Divers facteurs, tels que le *p*H ou l'acidité totale, demeurent beaucoup plus stables. L'indice de permanganate lui-même, censé représenter les polyphénols du vin, ne varie que dans d'étroites limites, et ces variations ne suivent pas toujours celles du pouvoir antibactérien.

Quant aux résultats fournis par les dosages de la matière colorante, ils s'avèrent dénués de toute signification. Ou bien il s'agit de méthodes chimiques, fondées en général sur la détermination de l'indice de méthoxyle, et l'on a vu quelle incertitude plane encore sur cette question. Ou bien l'on dose l'œnoside et l'œnidol par photométrie, après séparation chromatographique ou par l'alcool amylique.

Or, la matière colorante du vin subit de telles modifications de qualité au cours du vieillissement, qu'il faut perdre tout espoir de doser les anthocyanes du vin par de tels procédés.

Seul l'indice bactéricide, qui se rapporte avant tout à une propriété physiologique du colorant, semble évoluer de façon rationnelle en fonction du temps. D'abord faible, il atteint en quelques années une valeur maximum, suivie d'un plateau plus ou moins durable. Et lorsque le vin commence à perdre les qualités de l'âge mûr, lorsqu'une extrême vieillesse vient à bout de sa résistance, le pouvoir bactéricide s'estompe et disparaît. Le vin a cessé de vivre.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Un certain nombre de chercheurs ont étudié avant nous le pouvoir bactéricide des vins rouges, sans parvenir à isoler le principe responsable de cette propriété.

Par analogie avec les conclusions du travail de LANCEPLEINE sur l'action antimicrobienne des vins blancs, nous avons orienté nos recherches sur les constituants polyphénoliques, en espérant déceler parmi eux une substance particulièrement active.

Pour conserver un but pratique à ce travail, nous avons choisi le colibacille comme micro-organisme témoin. En effet, la destruction des entérobactériacées qui souillent fréquemment les eaux de boissons et les aliments pollués revêt un intérêt hygiénique et prophylactique évident. Il semble donc important de mieux connaître le rôle que peut jouer le vin rouge dans cette lutte contre les bactéries.

I. — Nous avons montré tout d'abord qu'un vin rouge décoloré par le charbon perd son pouvoir bactéricide. Celui-ci se trouve restauré lorsque la matière colorante repasse en solution.

II. — Pour simplifier l'isolement et la caractérisation du principe actif, nous avons poursuivi nos recherches sur les raisins rouges; ici encore, le pouvoir antiseptique semble détenu par les colorants. C'est l'œnidol, aglucone de l'anthocyanoside des raisins, qui s'avère responsable de ce phénomène. Dans les conditions expérimentales choisies, l'œnidol présente un coefficient-phénol égal à 33, et détruit le coli-

bacille à la dilution de 1 p. 10.000. Aucun autre constituant normal des raisins et des vins rouges ne se montre aussi actif.

III. — Dans les vins, nous proposons d'appeler *indice bactéricide* le pouvoir antiseptique comparé à celui du phénol. Cet indice subit des variations importantes au cours du vieillissement. En général, faible chez les vins jeunes, il atteint une valeur maximum après quelques années de conservation en bouteille. Une longue période de stabilisation vient ensuite, qui se termine par une disparition très lente du pouvoir antibactérien.

IV. — Les méthodes actuelles de dosage de l'œnidol, basées sur des techniques chimiques ou photométriques, ne permettent pas de suivre les variations qualitatives et quantitatives de ce pigment au cours du vieillissement des vins.

Seule une technique fondée sur une propriété physiologique de l'œnidol s'avère utilisable dans l'état actuel de nos connaissances.

La détermination de l'indice bactéricide semble répondre à cette exigence. Bien qu'il s'agisse d'une méthode indirecte, elle permettra sans doute de faciliter l'étude du comportement de l'œnidol dans les vins rouges.

BIBLIOGRAPHIE

1. Agostinucci, G. & Anzalone, B., *Nuov. Ann. Ig. Microbiol. Ital.*, 1952, **3**, 173-187.
2. Andersen, A. S. & Berry, J. A., *Science*, 1947, **106**, 644-645.
3. Bergey, D. H., Manual of Determinative Bacteriology, 1 vol. Baillière, Tindall and Cox, édit., London, 1948.
4. Carson, R. S. & Frisch, A. W., *Journ. Bact.*, 1953, **66**, 573.
5. Chantrill, B. & Coll., *Journ. of general Microb.*, 1952, **6**, 74.
6. Dickinson, L., *Journ. of general Microb.*, 1948, **2**, 154.
7. Dietze, cité par Perrin, J., *Journée vinicole*, 1950, **24**, 1.
8. Dourmischidze, cité par Deibner, L., *Ann. Technologie Agr.*, 1952, **1**, 345.
9. Dourmischidze, S. & Khatchidze, O., cités par Deibner, L., *Ann. Technologie Agr.*, 1952, **1**, 345.
10. Draczynski, M^me^, citée par Flanzy, M., *Bull. Off. int. Vin*, 1953, **26**, 83-143.
11. Fellenberg, Th. Von, d'après Ribéreau-Gayon, J. & Maurie, A., *Bull. Off. int. Vin*, 1942, **15**, 60-76.
12. Floch, H., *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 450-451.
13. Freudenberg, K., *Liebigs Ann. Chem.*, 1925, **444**, 135.
14. Freudenberg, K. & Maitland, P., *Journ. Intern. Soc. Leather Trades Chem.*, 1934, **18**, 156-159.
15. Gachot, H., *Journée vinicole*, 1950, **24**, n° 6775, 1.
16. Gautier, A., *C. R. Acad. Sc.*, 1892, **114**, 623-629.
17. Génevois, L. & Ribéreau-Gayon, J., Le Vin. Hermann, édit., 1947.
18. Gimel, R., *Ann. Pharm. française*, 1948, **6**, 318-320.
19. Glénard, A., *C. R. Acad. Sc.*, 1858, **47**, 268.
20. Green, R., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **71**, 84.
21. Hughes, J. F., *Antibiotic chemotherapy, U. S. A.*, 1952, **2**, 487-491.
22. Karrer, P. & Widmer, F., *Helv. Chim. Acta.*, 1927, **10**, 67.
23. Kitasato, S., *Zeitschr. f. Hyg.*, 1888, **3**, 404-406.
24. Laborde, J., *C. R. Acad. Sc.*, 1908, **147**, 993-995.
25. Lancepleine, J., Thèse Doct. Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1951.
26. Lévy, L. F., Posternack, T. & Robinson, R., *Journ. Chem. Soc.*, 1931, 2701-2715.

27. Mac Donald, R. E. & Bishop C. J., *Canad. Journ. Bot.*, 1952, **30**, 486-489.
28. Masquelier, J. & Point, G., Note dans Masquelier, J. & Jensen, H., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1953, **91**, 105-109, et travail inédit.
29. Masquelier, J. & Lancepleine, J., *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1189.
30. Maurie, A., *Bull. off. int. Vin*, 1942, **15**, 41-49.
31. Naghski, J., Copley, M. J. & Couch, J. F., *Science*, 1947, **105**, 125-126.
32. Nègre, E., Thèse Doct. (Sciences), Montpellier, 1945.
33. Neubauer, G. & Borgmann, E., *Zeitschr. anal. Chemie*, 1878, **17**, 442.
34. Perrot, E. & Goris, A., *Bull. Sc. Pharm.*, 1909, **16**, 190.
35. Peynaud, E., *Revue de Viticulture*, 1937, 422.
36. Pick, A., *Zentralblatt. für Bakter.*, 1892, 293-294; *Arch. für Hyg.*, 1893, 51-61.
37. Ribéreau-Gayon, J., Thèse Doct. (Sciences), Bordeaux, 1931.
38. Ribéreau-Gayon, J. & Maurie, A., *Bull. off. int. Vin*, 1942, **15**, 60-76.
39. Robinson, R., *Naturwiss*, 1932, **20**, 612.
40. Rosenheim, O., *Biochem. Journ.*, 1920, **14**, 178.
41. Ruehle, G. L. A. & Brewer, C. M., *U. S. Dept. Agr. Circ.*, 1931, 198 (test de Rideal et Walker).
42. Russel, A. & Todd, J., *Journ. Chem. Soc.*, 1937, 421.
43. Sabrazès, J. & Mercandier, R., *Ann. Inst. Pasteur*, 1907, **33**, 312.
44. Schraufstatter, E., *Experentia* (Suisse), 1948, **12**, 484-486.
45. Sherb, R. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 1945, **4**, 135.
46. Tayeau, F. & Masquelier, J., *Bull. Soc. Chim.*, 1948, **15**, 1167.
47. Tchogovadze, S., cité par Deibner, L., *Ann. Technologie Agr.*, 1952, **1**, 345.
48. Vincent, D., *La Presse Médicale*, 1953, **61**, 417.
49. Vogel, E., *Zeitschr. für angew. Chemie.*, 1891, 50-79.
50. Williams, V. & Taranova, R., cité par Deibner, L., *Ann. Technologie Agr.*, 1952, **1**, 345.
51. Willstaetter, R. & Mallison, H., *Liebigs Ann. Chem.*, 1915, **408**, 27.
52. Willstaetter, R. & Mallison, H., *Liebigs Ann. Chem.*, 1915, **408**, 147-162.
53. Willstaetter, R. & Mieg, W., *Liebigs Ann. Chem.*, 1915, **408**, 122-135.
54. Willstaetter, R. & Zollinger, E. H., *Liebigs Ann. Chem.*, 1915, **408**, 15.
55. Willstaetter, R. & Zollinger, E. H., *Liebigs Ann. Chem.*, 1916, **412**, 195.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT-PROPOS 1

INTRODUCTION 3

CHAPITRE PREMIER. — GÉNÉRALITÉS SUR LES POLYPHÉNOLS DU VIN 9

I. — Caractères généraux des pigments phénoliques naturels : flavones et anthocyanes 9

II. — Etude des colorants du vin rouge 15

CHAPITRE II. — RECHERCHE DU PRINCIPE BACTÉRICIDE DES VINS ROUGES 21

I. — Description des techniques bactériologiques 21

II. — Le vin, privé de ses polyphénols, perd son pouvoir bactéricide 24

III. — Le pouvoir bactéricide se retrouve parmi les substances adsorbées 26

IV. — Etude de l'élution 27

V. — Conclusions du chapitre II 30

CHAPITRE III. — IDENTIFICATION DU PRINCIPE BACTÉRICIDE 31

I. — Expériences préliminaires sur les raisins rouges. 32

II. — Effets produits par l'hydrolyse 34

III. — Préparation et activité d'un extrait purifié 35

IV. — Effets produits par l'élimination des flavonols 36

V. — Activité bactéricide de l'œnidol 38

VI. — Conclusions du chapitre III 41

Pages

Chapitre IV. — Evolution du pouvoir bactéricide des vins rouges au cours du vieillissement 43

I. — Evolution des polyphénols dans les vins rouges. 44

II. — Pouvoir bactéricide et vieillissement des vins 46

III. — Conclusions du chapitre IV 54

Conclusions générales 57

Bibliographie 59

Bordeaux. — Impr. E. Drouillard, 3, place de la Victoire.